

反义 IL-6 寡核苷酸对实验性系膜增生性肾炎 IL-6, IL-6mRNA 表达的影响

黄 胜, 孙 林, 叶任高

(中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】观察反义 IL-6 寡核苷酸经左肾动脉注入系膜增殖性肾小球肾炎 SD 大鼠后对肾小球系膜区 IL-6 mRNA 及蛋白水平的影响。【方法】30 只 SD 大鼠接受葡萄球菌内毒素静脉注射、牛血清白蛋白隔日口服、完全弗氏佐剂及不完全弗氏佐剂皮下注射,并加做肝左叶切除术,制作系膜增生性肾小球肾炎动物模型。经 FAM 标记的反义寡核苷酸肾小球定位后,将 IL-6 反义、正义、及错义寡核苷酸由左肾动脉注入肾脏,并用右肾作对照,分别作常规组织病理,免疫组织化学及原位杂交检测。【结果】FAM 标记的 IL-6 反义寡核苷酸经左肾动脉注入后 1 h,系膜区可检测到少量表达,6 h 后肾系膜区表达明显增加。反义寡核苷酸治疗组的 SD 大鼠 IL-6、IL-6 mRNA 表达被显著抑制 ($P < 0.01$),但 IL-6 正义及错义寡核苷酸对 IL-6、IL-6 mRNA 表达无明显影响 ($P > 0.05$)。3 组蛋白尿及病理改变均无显著差异 ($P > 0.05$)。【结论】脂质体介导的反义寡核苷酸(IL-6)能在肾小球表达。IL-6 反义寡核苷酸治疗显著抑制系膜增生性肾炎 SD 大鼠 IL-6、IL-6 mRNA 表达,但 IL-6 正义、及错义寡核苷酸无此作用。

关键词: 白细胞介素 6; 寡核糖核苷酸类, 反义; 脂质体; 肾小球肾炎

中图分类号: R692.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2003)01-0035-04

Effect of IL-6 Antisense Oligodeoxynucleotide on the Expressions of IL-6 and IL-6mRNA in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis

HUANG Sheng, SUN Lin, YE Ren-gao

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of IL-6 antisense oligodeoxynucleotide on the expressions of IL-6 mRNA and protein in mesangium in SD rat with mesangial proliferative glomerulonephritis. 【Methods】30 SD rats models of mesangial proliferative glomerulonephritis were made by the veinal injection of Staphylococcal-Enterotoxin-B and subcutaneous injection of immunological adjuvants and the resection of partial hepatic lob. IL-6 antisense oligonucleotide labeled by FAM was located in the glomerulus, then the IL-6 antisense, sense and wrong oligodeoxynucleotide was injected into the left kidney through the left renal artery, the right kidney was as the control, The evaluation of pathology, immunohistochemical and in situ hybridation were performed respectively. 【Results】IL-6 antisense oligonucleotide labeled by FAM injection was expressed lightly in the glomerular mesangium one hour after injection, but expressed significantly 6 hours after injection. The IL-6 and IL-6 mRNA were inhibited significantly in the antisense oligodeoxynucleotide group ($P < 0.01$), whereas the sense oligodeoxynucleotide and wrong oligodeoxynucleotide did not show any effect on it ($P > 0.05$). However, the urine protein output and the number of mesangial cell in the antisense oligodeoxynucleotide group were similar to those in the sense oligodeoxynucleotide and wrong oligodeoxynucleotide groups ($P > 0.05$). 【Conclusion】IL-6 antisense oligodeoxynucleotide package by liposomes can be expressed in glomerular mesangium and it inhibits the expression of IL-6 mRNA and IL-6 protein, but

收稿日期:2002-02-22

基金项目:广东省科委科技攻关基金资助项目(1996[15])

作者简介:黄 胜(1971-),男,四川内江人,博士生,主治医师.

sense and wrong oligodeoxynucleotide have no effects on it.

Key words: interleukin-6; oligodeoxynucleotide, antisense; liposomes; glomerulonephritis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):35~38,45]

人白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)的相对分子质量为21 000~26 000,是由184个氨基酸残基组成的糖蛋白。孙林等^[1]发现系膜增生性肾炎IL-6 mRNA水平增高,Horri等^[2]认为肾小球系膜细胞分泌的IL-6可能通过作用于转移生长因子 β (TGF- β),引起TGF- β 表达增多,进而引起基质增生及肾小球硬化。反义寡核苷酸通过与胞浆内mRNA结合,妨碍RNA-核糖体的形成,从而干扰其翻译过程,或者与RNA结合后激活RNA酶-H的活性,导致RNA降解。经硫代修饰和阳离子脂质体包裹后,能成倍提高反义寡核苷酸到达靶器官的数量。在系膜增生性肾炎治疗方面,针对TGF- β mRNA的反义寡核苷酸经肾动脉注入肾脏后能降低TGF- β 引起的系膜基质增生^[3],但未见IL-6反义寡核苷酸在该病中的应用,因此我们研究针对IL-6 mRNA的反义寡核苷酸经肾动脉注射后,其在肾小球的表达部位及对肾小球IL-6 mRNA和蛋白表达及病理改变的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

30只160~200 g 6周龄健康雄性SD大鼠,购自中山医科大学动物实验中心。葡萄球菌肠内毒素(解放军军事医学科学院微生物研究所生产)。IL-6抗体(Gene公司)。免疫组化试剂盒,原位杂交试剂盒(武汉博士德试剂公司)。FAM标记的IL-6 ASODN序列:5'-GGAAGTTCATAGCTGG-3',其5'端经FAM标记。反义IL-6寡核苷酸序列:5'-GGAAGTTCATAGCTGG-3';正义IL-6寡核苷酸序列:5'-GGAAGTTCATAGCTGG-3';错义IL-6寡核苷酸序列:5'-TGTCGGAGTCGTGAA-3';3者两端均经硫代修饰。地高辛标记的IL-6寡核苷酸探针序列:5'-CTATTTGCCGAAGAGCCTCAG-GCTGGACTG-3'(以上均由上海生物细胞工程公司合成)。

1.2 系膜增生性肾炎大鼠模型的建立^[4]

SD大鼠30只,在正常饲养的基础上,从实验的第1天起隔日每只以牛血清白蛋白20 mg(配成水溶液),用自制的灌胃管隔日灌胃,共14周,于实

验第1天给皮下注射完全弗氏佐剂0.2 mL(含牛血清白蛋白2 mg),次日行肝左叶切除,第8天经皮下注射不完全弗氏试剂0.2 mL(含牛血清白蛋白2 mg),并同时从静脉注射葡萄球菌肠内毒素0.4 mg/kg,第15天再从静脉注射葡萄球菌肠内毒素0.4 mg/kg。

1.3 IL-6反义寡核苷酸在肾小球系膜区的定位

FAM标记的IL-6反义寡核苷酸置于3 000 r/min的高速离心机离心10 min,加入9 g/L NaCl稀释为1 g/L,任选2只SD大鼠,应用30 g/L戊巴比妥50 mg/kg腹腔内注射进行麻醉,经腹主动脉逆行向左肾动脉注射。分别于1 h、6 h处死,取出左侧肾脏,经40 g/L多聚甲醛固定、常规酒精脱水后,包埋,切片,在免疫荧光镜下观察。右侧肾脏用100 mL/L福尔马林液固定,脱水包埋作常规病理检查,免疫组化染色及原位杂交。

1.4 IL-6反义寡核苷酸对系膜增殖性肾炎IL-6的影响

1.4.1 大鼠分组与预处理 将大鼠随机分成I、II、III 3组,每组6只,共18只。反义、正义及错义寡核苷酸分别与阳离子脂质体按0.8:1质量比混匀后贮存于4℃冰箱中待用。将大鼠用30 g/L戊巴比妥按50 mg/kg施行麻醉,打开腹腔,分离出腹主动脉及左肾动脉,按上述FAM标记IL-6反义寡核苷酸注入法,各组分别注入10 μ g反义、正义、错义寡核苷酸,并同时夹闭右肾动脉,整个注射过程不超过3 min,以消除缺血再灌注对本研究观察项目的影 响。收集第3天,第5天24 h尿测尿蛋白,然后于第6天处死,取双肾分别用40 g/L多聚甲醛、100 mL/L福尔马林或Bouins液固定,脱水,包埋,切片,置于4℃冰箱中待检。所有死亡的大鼠从余下的12只中再挑选重作,确保每组6只。

1.4.2 IL-6蛋白表达的检测 选择第5天的同一SD大鼠左、右肾切片脱蜡至水。新鲜配置3 mL/L H₂O₂,室温5~10 min以灭活内源性酶,切片浸入0.01 mol/L pH6.0枸橼酸盐缓冲液,微波修复抗原。加抗原修复液室温10 min,加正常血清封闭液,室温20 min,加适当稀释的1抗(1:100)37℃ 2 h,加生物素化山羊抗兔IgG,加试剂链酶亲和素SABC 30℃ 20 min, DAB显色,拍照。

1.4.3 IL-6mRNA 水平的检测 所有溶液加入 DEPC,按 1:1 000 稀释,Poly-lysine 处理过的石蜡切片常规脱蜡脱水。新鲜配置 3 mL/L H₂O₂/甲醇。室温处理 30 min 以灭活内源性过氧化物酶,切片上加 0.5 mol/L TBS(pH7.4)1:200 稀释的蛋白酶 K,37 °C 消化 5~15 min,取地高辛标记的 IL-6 寡核苷酸探针及原位杂交液,湿盒中 37 °C 杂交 24 h,加封闭液室温 20 min,加小鼠抗地高辛抗体,30 °C 30 min,加生物素化羊抗小鼠 IgG 30 °C 20 min,加链酶亲和素 SABC,DAB 显色,然后镜检、拍照。

1.5 半定量分析

在显微镜下观察切片杂交信号并照相。用 IBAS2.0 计算机图像分析系统对上述切片的杂交信号进行吸光度扫描,由计算机计算每个肾小球细胞内的 IL-6mRNA 杂交阳性信号与肾小球细胞总面积,以半定量比值:(阳性信号总面积/肾小球总面积×100%)×(256-平均灰度),表示 mRNA 表达强度。数值越大,说明表达量越多。采取相同的图象分析方法计算 IL-6 蛋白的表达。即由计算机计算每个肾小球的 IL-6 阳性细胞与肾小球总面积,以半定量比值:(阳性细胞总面积/肾小球总面积×100%)×(256-平均灰度),表示 IL-6 的表达。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件进行检验,每只大鼠取 20 个肾小球,对分别经反义、正义、及错义寡核苷酸处理的左肾,采用方差分析(Student-Newman-Keuls *q* 检验)进行统计学分析,同组左右肾比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 一般情况

SD 大鼠在形成系膜增生型肾小球肾炎后,其忍耐手术打击力的能力下降,在本实验中,手术后的恢复很慢,倦卧、萎靡加重。在 3 组实验中有 3 只大鼠手术后 6 h 内死亡,2 只于 4 d 时死亡,均排除研究之外。

2.2 FAM 标记 IL-6 反义寡核苷酸在肾小球的表达

FAM 标记的反义寡核苷酸-脂质体复合物能

于 1 h 后在肾组织中获得表达,主要在肾小球系膜区表达(图 1A),6 h 后在肾小球系膜区表达明显增加,肾小管开始出现表达(图 1B)。该结果表明脂质体能介导反义寡核苷酸进入肾小球系膜细胞。

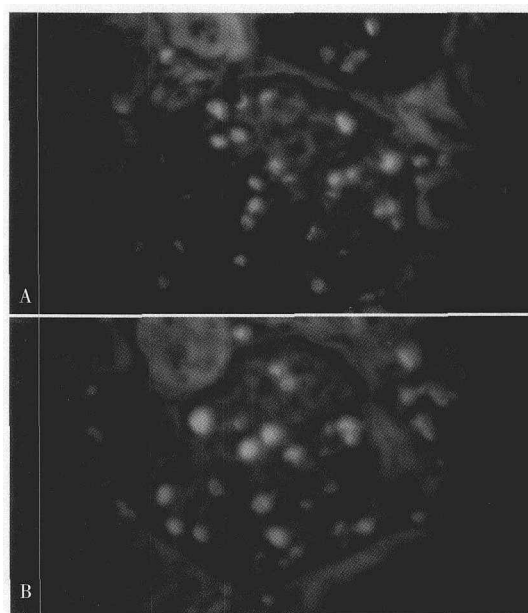


图 1 FAM 标记的 IL-6 反义寡核苷酸在肾小球的表达
Fig. 1 The expression of IL-6 ASODN labeled by FAM in glomerulus (immunofluorescence)

A: 1 h after injection, B: 6 h after injection

2.3 系膜增生性肾小球肾炎 IL-6 蛋白的合成

免疫组化显示:与正义寡核苷酸处理组(38.17±12.91)及错义处理组(37.74±12.86)左肾 IL-6 的阳性信号相比较,IL-6 反义寡核苷酸处理组的左肾 IL-6 阳性信号(23.75±10.53)有明显下降,并且与自身右肾(36.74±11.71)相比差异有统计学意义($P < 0.01$);与正义组(37.58±12.31)及错义组(38.75±12.58)的右肾相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。正义及错义二组左右肾 IL-6 阳性信号之差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 系膜增生性肾小球肾炎 IL-6 mRNA 的表达

原位杂交显示:IL-6 反义寡核苷酸处理组肾 IL-6 mRNA 的表达(61.85±13.92)(图 2A)与对照组肾(77.23±15.38)相比明显下降(图 2B),差异有显著统计学意义($P < 0.01$),与正义处理肾(77.82±14.33)及错义处理肾(75.27±16.34)比较差异有统计学意义($P < 0.01$);但正义及错义组无论是左肾还是右肾的 IL-6 mRNA 的表达差异

均无统计学意义($P > 0.05$)。

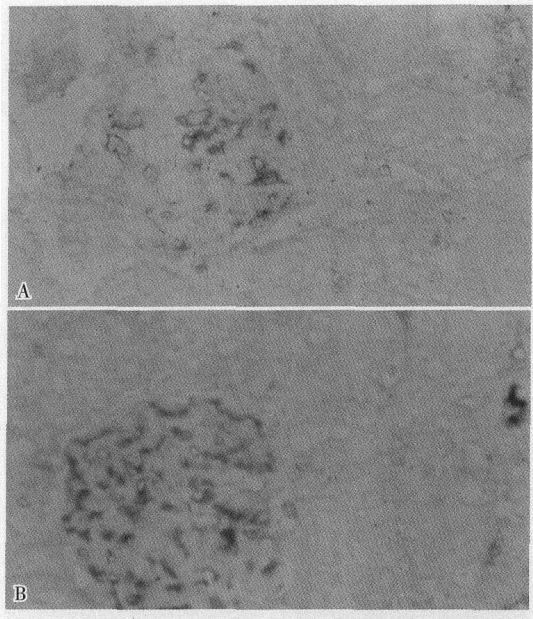


图2 对照组与 IL-6 反义寡核苷酸处理组肾系膜细胞 IL-6 mRNA 的表达

Fig. 2 The expression of IL-6 mRNA in the glomerular mesangial cell of control group and group treated by IL-6 ASODN (situ hybridation)

A: The expression of IL-6 mRNA in the glomerular mesangial cell of control group, B: The expression of IL-6 mRNA in the glomerular mesangial cell treated by IL-6 ASODN

2.5 治疗后病理情况

IL-6 反义寡核苷酸处理组平均每个左肾的肾系膜细胞数(48.3 ± 13.7),与右肾的肾系膜细胞数(52.4 ± 14.5)相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);正义寡核苷酸组左肾(53.73 ± 12.71)及错义寡核苷酸处理组左肾(54.32 ± 12.31)的肾系膜细胞数,与各自的右肾系膜细胞数(50.25 ± 12.32 , 55.58 ± 13.47)相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

系膜增生性肾炎是人类原发性肾小球疾病最常见的病理类型,约占整个肾脏疾病的 50% ~ 60%。IL-6 是系膜细胞分泌调节因子。在正常情况下,系膜细胞分泌 IL-6 存在着一种负反馈机制。当致病因素,如外来抗原、免疫复合物沉积于系膜区,可刺激系膜细胞分泌 IL-6 异常增多,而

IL-6 又可刺激系膜细胞的增殖,二者互为因果,形成恶性循环。肾脏作为基因治疗的靶器官的显著优势是基因可以通过多种途径到达肾脏。例如,经肾动脉注射,经尿道逆行转运,以及直接注入肾间质等。反义寡核苷酸目前已广泛运用于各种体内及体外试验,以期达到抑制特定基因表达的目的。通常其为 16-30 个碱基的单链 DNA。带负电荷的寡核苷酸与阳离子脂质体结合是一个自发的过程,两者之间的相互吸引力是促进寡核苷酸-脂质体复合物形成的主要动力^[5],结合后更有利于寡核苷酸进入细胞。近来的研究表明脂质体在体内是高效且无毒性作用^[6]。在本实验,我们设计了针对 IL-6 mRNA 启动部分的反义寡核苷酸,与阳离子脂质体结合后,通过左肾动脉直接注射入肾脏。日本学者 Meshima 等^[7]认为脂质体与日本仙台病毒(HVJ)结合时可在肾小球系膜大量表达,而没有 HVJ 结合的阳离子脂质体仅在肾小管表达。但我们的实验表明,FAM 标记的 IL-6 反义寡核苷酸能在肾小球系膜区表达,与 TGF- β 脂质体-反义寡核苷酸复合物在肾小球系膜区表达相类似^[3]。反义寡核苷酸的吸收是一个快速过程,一般在 30 ~ 60 min 达到一个比较稳定的水平^[8]。我们的研究显示 FAM 标记的 IL-6 脂质体-ODN 复合物于 60 min 出现在系膜区,6 h 后其表达明显增强,与国外的结果基本相似。

IL-6 反义寡核苷酸已被证实对肝癌细胞的增生有抑制作用^[9],但对肾小球系膜细胞的体内作用国内外尚无文献报道。我们发现 IL-6 反义寡核苷酸确有明显降低 IL6 mRNA 水平表达的作用,对 IL-6 蛋白水平亦有明显影响,但对肾小球病理改变无太大作用。我们的研究之所以出现 IL-6mRNA 及蛋白的改变明显,而病理改变不明显的结果,除条件限制外,可能还与慢性肾脏疾病需反义寡核苷酸重复注射有关,因为它的半衰期仅 3 ~ 5 d^[10]。

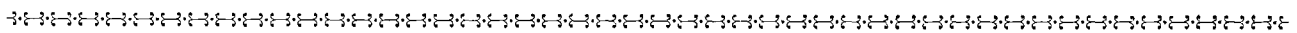
本实验正义及错义寡核苷酸均无抑制 IL-6mRNA 表达的作用,提示 IL-6 反义寡核苷酸可能以碱基互补原则与 IL-6mRNA 结合形成杂合体,后者成为 RNAaseH 的底物而被降解,释放的 IL-6 反义寡核苷酸再结合另一条 IL-6mRNA,从而继续发挥作用。但这也有可能是 IL-6 反义寡核苷酸与起始密码互补性结合,阻断核糖体附着,从而终止 IL-6 蛋白的翻译。(下转第 45 页, to page 45)

参考文献:

- [1] Jeffreys A J, Macleod A, Tamaki K, *et al.* Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing[J]. *Nature*, 1991, 354(350):204.
- [2] Armour J A L, Harris P C, Jeffreys A J. Allelic diversity at minisatellite MS205 (D16S309): evidence for polarized variability[J]. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(8):1137.
- [3] Huang X L, Tamaki K, Yamamoto T, *et al.* Analysis of allelic structures at the D7S21 (MS31A) locus in the Japanese, using minisatellite variant repeat mapping by PCR (MVR-PCR) [J]. *Ann Hum Genet*, 1996, 60 (Pt4):217.
- [4] Jobling M A, Bouzekri N, Taylor P G, *et al.* Hyper-variable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (D Y F 1 5 5 S 1) [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(4):643.
- [5] Bao W, Zhu S, Pandya A, *et al.* MSY2: a slowly evolving minisatellite on the human Y chromosome which

- provides a useful polymorphic marker in Chinese populations[J]. *Gene*, 2000, 244(1-2): 29.
- [6] Bouzekri N, Taylor P G, Hammer M F, *et al.* Novel mutation processes in the evolution of a haploid minisatellite, MSY1: array homogenization without homogenization[J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(4):655.
- [7] 庾 蕾,伍新尧. 等位基因测序的简便、快速方法[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(6):479.
- [8] Jobling M A, Samara V, Pandya A, *et al.* Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(11):1767.
- [9] Monckton D G, Tamaki K, Macleod A, *et al.* Allele-specific MVR-PCR analysis at minisatellite D1S8 [J]. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(5):513.
- [10] Dupuy B M, Andreassen R, Frones A G, *et al.* Y-chromosome variation in a Norwegian population sample [J]. *Forensic Sci Int*, 2001, 117 (3):163.

(编辑 黄小廷)



(上接第 38 页 from page 38)

参考文献:

- [1] 孙 林,叶任高,曾丽霞,等. 系膜增殖性肾炎患者肾小球系膜细胞 IL-6, GP130 和 JunB mRNA 表达及其意义[J]. *中华肾脏病杂志*, 1998, 14(1):3.
- [2] Horri Y, Maraguchi A, Iwano M, *et al.* Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *J Immunol*, 1989, 143(12):39.
- [3] Akagi Y, Iskaka Y, Arai M, *et al.* Antisense oligonucleotides for TGF- β suppressed glomerular sclerosis of phenotypic change of mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1995, 6(2):860.
- [4] 刘 震,周树录,谭建三,等. 大鼠系膜增殖性肾小球肾炎模型的改进 [J]. *华西医科大学学报*, 1996, 27 (2):182.
- [5] Meidan V M, Cohen J S, Amariglio N, *et al.* Interaction of oligonucleotides with cationic lipids: the relationship between electrostatics, hydration and state of aggregation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1464(2):251.
- [6] San H, Yan Z Y, Pomphiel V J, *et al.* Safety and short

- term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy [J]. *Human Gene Ther*, 1993, 4(6): 781.
- [7] Meshima Y, Kashihara N, Sugiyama H, *et al.* Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion by antisense oligonucleotides. Targeting platelet-derived growth factor and transforming growth factor B mRNA *in vivo* [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1994, 5(3): 835.
- [8] Wu Pong S, Weiss T L, Hunt C A. Antisense c-myc oligodeoxynucleotide cellular uptake [J]. *Pharm Res*, 1992, 9(8): 1010.
- [9] Toda K, Kumagai N, Tsuchimoto K, *et al.* Induction of hepatic stellate cell proliferation by LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cirrhosis [J]. *Gastroenterol*, 2000, 35(3): 214.
- [10] Agrawal S, Zhang X, Lu Z, *et al.* Absorption, tissue distribution and *in vivo* stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotides following oral administration [J]. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50(4): 571.

(编辑 黄小廷)